研究ノート

マウスの糞中に存在する消化管内微生物
由来の純タンパク質

山中聖敬*, 亀高正夫**

*(財)実験動物中央研究所

**共立女子大学家政学部食物学科

Fecal True Protein Originally Derived
from Intestinal Microbes in MiceMasanori YAMANAKA*
and Masao KAMETAKA***Central Institute for Experimental Animals,
Nogawa, Kawasaki 213**Department of Food Science and Nutrition,
Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's
University, Chiyoda-ku, Tokyo 101Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 40, 141~144 (1987)

True proteins originating from intestinal microbes and related materials in fecal dry matter of mice were investigated. A purified whole-egg protein diet and an amino acid mixture diet with the same amino acid composition as purified whole-egg protein were prepared to have the same levels of nitrogen. These diets were given to ICR strain male conventional and germfree mice from five to eight weeks of age for three weeks. Comparisons were made between the feces of the last week of conventional and germfree mice fed on the two kinds of diets with respect to the contents of true protein (protein nitrogen of feces $\times 6.25$) in fecal dry matter. As a result, there was 0.94% true protein from the intestinal microbes and related materials in fecal dry matter of mice fed on the purified whole-egg protein diet and 2.18% true protein in that of mice fed on the amino acid mixture diet. Furthermore, 5.1% true protein from the debris of the epithelium of the alimentary canal and digestive juice and 1.23% true protein from undigestible food residue were observed.

(Received September 18, 1986)

動物の糞成分をその由来で大別すると、1) 未消化の飼料残渣、2) はく離した消化管上皮および消化液、3) 消化管内微生物とその関連物質、の三つが考えられる。たとえば糞中に、消化管内微生物とその関連物質と

がどれくらい含まれているのかを知りたくても上記1) ~ 3) のおのおのを分離して測定する手段がないため、現在のところ明らかでない。もし、出納法による栄養効果の測定試験に際し、糞成分をその由来ごとに分別測定できたならば、上記1) を用いて求めた供試飼料の消化率はより本質に近づくし、2), 3) の代謝窒素量が明らかになることにより、無タンパク質飼料を与えたときの糞中窒素をもってその量とみなしている操作が不要にさえてくる。

本実験は糞中の純タンパク質量を指標として、つぎの2種の試験を実施し、上記2) および3) に由来する純タンパク質量を明らかにするために計画された。まず、a) 普通 (conventional, 以下 CV) マウスの糞の純タンパク質量から無菌 (germfree, 以下 GF) マウスの糞の値を差し引くことにより、上記3) の消化管内微生物とその関連物質由来の純タンパク質量を求める。b) として結晶アミノ酸混合物を窒素源とする飼料を摂取したときの糞には未消化の飼料残渣由来の純タンパク質は含まれないことから、GF マウスにこの飼料を与えることにより、上記2) のはく離した消化管上皮および消化液に由来する部分の純タンパク質量を求める。

実験方法

1. 飼料

前報¹⁾と同じ2種類の飼料を用いた。一つは精製全卵タンパク質飼料で、他の一つは結晶アミノ酸混合物飼料である。すなわち、精製全卵タンパク質: 10.6%, トウモロコシ油: 8.0%, 濾紙粉末: 4.0%, 無機塩類混合物: 4.0%, ビタミン混合物: 2.0%, トウモロコシデンプン: 71.4% の割合とした飼料 (以下 WE 飼料) とトウモロコシ油、濾紙粉末、無機塩類混合物およびビタミン混合物は上記 WE 飼料と同じものを同量用い精製全卵タンパク質と同じアミノ酸組成²⁾をもつ結晶アミノ酸混合物: 11.9%, トウモロコシデンプン: 70.1% とした飼料 (以下 AA 飼料) を調製した。これら2種の試験飼料にコバルト 60 を 5 Mrad 照射して滅菌した後、この滅菌飼料と飲水 (オートクレーブ滅菌) をマウスに自由摂取させた。両飼料の窒素含有量は WE 飼料が 1.50%, AA 飼料は 1.57% (いずれも分析値) で、窒素量 $\times 6.25$ では WE 飼料: 9.40%, AA 飼料: 9.78% であった。

2. 動物

実験には ICR 系の CV および GF マウスのオスを使用し、5週齢から8週齢までの3週間、WE または AA 飼料のいずれかを摂取させた。1 ケージあたり3匹から5匹のマウスを、金網床のケージ (市販のマウス用プラスチックケージサイズ: 175 $\times$ 245 $\times$ 125 mm—の底面を金網床に改造) に収容、飼育した。糞採取の7週

* 〒213 川崎市宮前区野川 1430

** 〒101 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

Table 1. Daily body weight and food intake in conventional and germfree mice fed a purified whole-egg protein or amino acid mixture.

	WE diet			AA diet		
	Group	CV	GF	Group	CV	GF
Number of mice	{ A B	4 5	4 4	A B	4 3	3 3
Daily body weight (g) from 7 to 8 weeks of kage	{ A B	32.6±1.3* 31.7±1.1	31.5±1.5 31.1±2.0	A B	31.7±1.7 31.3±2.1	28.8±0.8 27.8±1.8
Food intake (g)/day/mouse	{ A B	4.1 3.7	3.5 3.4	A B	3.2 3.5	3.0 3.1
Food intake (g)/day/100 g of body weight	{ A B	12.5 11.7	11.1 11.0	A B	10.0 11.2	10.2 11.3

* Means±SD.

WE diet, diet using purified whole-egg protein as nitrogen source; AA diet, diet using amino acid mixture as nitrogen source; CV, conventional mice; GF, germfree mice; A and B, name of mouse group.

齢から8週齢までの1週間は毎日または1日おきに体重を測定すると同時に、各ケージごと1週間の飼料摂取量の測定と糞全量を採取した。採取した糞に0.1規定塩酸溶液を噴霧し、室温で乾燥後粉碎して下記の分析に供した。

3. 糞の分析

各ケージごと1週間分の糞について、105°Cで2時間乾燥後秤量、の操作をくり返して恒量値を求める方法により乾物量を測定した。純タンパク質については、糞をバルンスタイン沈殿法で⁹⁾処理した後、ケルダール法により窒素量を求め、それに6.25を乗じたものを糞中の純タンパク質量とした。

結果および考察

1. 供試マウスの平均体重と飼料摂取量

WE または AA 飼料を摂取させた各群（ケージ）ごとの CV および GF マウス数その他を Table 1 に示した。7週齢から8週齢までの糞採取期間における毎日の体重では、AA 飼料を摂取させた GF マウスが小さかった。考えられる一つの理由として、供試マウスを同じ集団から選び、同時に飼育実験をすることができなかったこと、すなわち、飼育実験実施時期の違いがこの結果をもたらしたのと考えられた。いずれのマウスも、WE または AA 飼料の給与を開始した5週齢時から順調な体重増加を示し、Table 1 の7週齢から8週齢においても、その体重はやや増加の傾向を示していた。

マウス1匹あたりの飼料摂取量 (Table 1) では WE および AA 飼料ともに、CV マウスが GF よりもやや多く、WE 飼料群が AA 飼料群の摂取量よりも多い傾向にあった。体重あたりに換算した摂取量では CV と GF マウスの間、WE 飼料と AA 飼料の間でほとんど変わら

なくなった。筆者の別の実験⁹⁾における天然原料で調製し、オートクレーブ滅菌した CL-2 飼料を与えたオスの ICR 系 CV および GF マウスの体重は、本実験のそれとはほぼ同じで、1日体重 100 g あたりの飼料摂取量は CV では 14~16 g、GF では 11~13 g であった。本実験とは飼料の条件も大きく異なっており、直接の比較は困難であるが、Table 1 の体重や飼料摂取量はほぼ妥当なものと考えられた。

2. 乾物排泄量

Table 2 に乾物排泄量を示した。WE 飼料群の乾物排泄量では CV と GF マウスの間に明らかな違いはなかったが、AA 飼料群では CV マウスが GF よりも多い傾向を示した。なお、WE 飼料群の乾物排泄量は CV、GF マウスともに AA 飼料群よりも多かった。このときの WE 飼料摂取 CV マウスにおける乾物のみかけの消化率 (%) は A 群: 81.8、B 群: 82.3、GF マウスの A 群: 81.6、B 群: 79.5 であった。これに対し AA 飼料摂取 CV マウスの消化率は A 群: 84.8、B 群: 84.0、GF マウスの A 群: 85.5、B 群: 85.1 であった。これらの消化率は Table 2 の結果をほぼ裏づけていた。消化管内微生物とその関連物質が混入する CV マウスの糞に比べ、それらを欠く GF マウスの糞の乾物量は少ないのが当然とも考えられ、AA 飼料群はほぼそのようになっていたが WE 飼料群では規則的な傾向を認めなかった。

3. タンパク態窒素排泄量

マウスにおいて、本実験のごとく1ケージあたり3匹から5匹の群飼で、1週間分の糞を採取しようとするとき、尿の付着がいっさいない糞のみを得るのは困難である。そこで、一つの指標としては尿付着の有無にあまり左右されないタンパク態窒素を選び、また、他の指標としては糞の量あるいは組成を論じる上での基本的物量で

Table 2. Fecal dry matter in conventional and germfree mice fed a purified whole-egg protein or amino acid mixture.

	WE diet			AA diet		
	Group	CV	GF	Group	CV	GF
mg/day/mouse	A	679	591	A	451	399
	B	601	642	B	523	439
mg/day/100 g of body weight	A	2,083	1,876	A	1,424	1,383
	B	1,899	2,065	B	1,670	1,579
mg/day/100 g of body weight computed same levels of dry matter intake	A	1,817	1,841	A	1,520	1,447
	B	1,767	2,049	B	1,599	1,495

For abbreviations, see Table 1.

Table 3. Fecal protein nitrogen in conventional and germfree mice fed a purified whole-egg protein or amino acid mixture.

	WE diet			AA diet		
	Group	CV	GF	Group	CV	GF
mg/day/mouse	A	8.1	6.4	A	5.7	3.5
	B	6.8	6.1	B	5.6	3.3
mg/day/100 g of body weight	A	24.8	20.2	A	18.0	12.2
	B	21.6	19.5	B	17.7	11.8
mg/day/100 g of body weight computed same levels of nitrogen intake	A	22.4	20.6	A	19.5	13.0
	B	20.9	20.1	B	17.2	11.4

For abbreviations, see Table 1.

あると同時に、その絶対量が多いため、上述の尿の付着があっても結果にあまり影響を与えない乾物量を選んだ。Table 3 にタンパク態窒素排泄量を示した。WE 飼料摂取 CV マウスのタンパク態窒素量は GF マウスよりやや多く、AA 飼料群では CV マウスが GF より明らかに多かった。つぎに、WE 飼料と AA 飼料との間では前者のほうが大であった。菌体には高濃度のタンパク質が含まれていることから、CV マウス糞のタンパク態窒素量が GF より多いのは当然と考えられる。さらに、AA 飼料の窒素源はアミノ酸の形態であるが、一方、WE 飼料ではタンパク態であり、その上、未消化の飼料残渣由来のタンパク態窒素も加わるため、WE 群が高いのはこれも当然と考えられる。梅原らの報告⁵⁾による無抗原飼料を摂取した CV マウスの糞中タンパク態窒素量は 1 匹 1 週間あたり 7.6~8.6 mg、GF マウスは 4.2~5.3 mg であった。本実験の例と比較して量的には少なかったが、CV マウスが GF より多い傾向は一致した。

4. 糞中の純タンパク質含有量

糞には非タンパク態の窒素も含まれ、消化管内微生物とその関連物質にも、タンパク態以外に非タンパク態の窒素も含まれていると考えられる。しかし既述のとおり、

尿の付着がない糞のみを採取するのは困難であったことから、たとえその付着があったとしても、結果にあまり影響を与えないと考えられる乾物および純タンパク質量（タンパク態窒素量×6.25）の数値を基礎として求めた糞中の純タンパク質含有量を Table 4 に示した。これをみると、消化管内微生物とその関連物質由来のタンパク質や、はく離した消化管上皮および消化液由来のタンパク質が、糞乾物中にどの程度含まれているかを知ることができる。

Table 4 の脚註に記したとおりのおの 2 例の平均値から次のように説明できる。すなわち、ほぼ同じ窒素含有量、同じアミノ酸組成ではあるが、一方はタンパク質の形態の WE 飼料と、他方はアミノ酸の形態の AA 飼料を摂取した GF マウスでは、糞中に消化管内微生物とその関連物質とをともに欠いている。この AA 飼料群の糞タンパク質は、はく離した消化管上皮および消化液由来のタンパク質であって、その量は 51.0 mg、すなわち糞乾物中の 5.1% と考えた。WE 飼料摂取 GF マウスでは上記に加えて未消化の飼料残渣由来のタンパク質が存在し、ここで 63.3 mg から 51.0 mg を差し引いた 12.3 mg、糞乾物中の 1.23% を未消化の飼料残渣由来

Table 4. True protein* per 1,000 mg of fecal dry matter of conventional and germfree mice fed a purified whole-egg protein or amino acid mixture.

	Group	CV (mg)	GF (mg)	CV-GF (mg)
WE diet fed mice	A	74.2	67.4	(9.4)
	B	71.1	59.1	
		(72.7)**	(63.3)	
AA diet fed mice	A	79.2	55.2	(21.8)
	B	66.3	46.8	
		(72.8)	(51.0)	

* Protein nitrogen $\times 6.25$.

** Numbers in parentheses show mean from the two numerical values; 0.94% true protein in fecal dry matter: true protein from the intestinal microbes and related materials in mice fed the purified whole egg protein diet (72.7–63.3=9.4); 2.18% true protein in fecal dry matter: true protein from the intestinal microbes and related materials in mice fed the amino acid mixture diet (72.8–51.0=21.8); 5.1% true protein in fecal dry matter: true protein from the debris of the epithelium of the alimentary canal and digestive juice; 1.23% true protein in fecal dry matter: true protein from undigestible food residue (63.3–51.0=12.3).

For abbreviations, see Table 1.

のタンパク質とみなした。本実験の目的として求めたい消化管内微生物とその関連物質由来のタンパク質量は、CV の値から GF の値を差し引いたものと考えることができ、WE 群で 9.4 mg すなわち糞乾物中の 0.94%，AA 群ではそれぞれ 21.8 mg，2.18% となった。

WE 群と AA 群とで消化管内微生物とその関連物質由来のタンパク質量が異なったが、これらの理由を明確に説明することはできない。一つの可能性として、飼料の種類によって、はく離した消化管上皮および消化液由来のタンパク質量が異なることも考えられ、その影響が上記消化管内微生物とその関連物質由来のタンパク質量の違いとして現われたのかもしれない。飼料原料の一部としてしばしば用いられ、かつ、微生物の一つでもある酵母のタンパク質含有量は 36.9–38.8%⁶⁾、46.0%⁷⁾とされ、マウスの消化管内に生息し糞中に排泄された微生物そのもの（菌体）のタンパク質含有量は酵母の例に近いものと推測できる。したがって、マウスの糞中に排泄された微生物そのもの（菌体）の量は、ここでの純タンパク質量で示した量よりも、ある程度多くなるものと考えられる。今後、例数を増したり、また、飼料に適当な指示物質を加えたりして研究を進めることにより、本実験の目的とした課題について、より明確な解答を得ることが期待できる。

要 約

マウスの消化管内に存在する微生物とその関連物質由来の純タンパク質が、糞乾物中にどの程度含まれているかを調べた。窒素源として精製全卵タンパク質または精製全卵タンパク質と同じアミノ酸組成をもつ結晶アミノ

酸混合物を用い、両者が同じ窒素含有量になるように飼料を調製した。これら2種類の飼料を5週齢でオスのICR系普通および無菌マウスに3週間摂取させた。最後の1週間分の糞について、その乾物中に占める純タンパク質（糞中のタンパク質態窒素量 $\times 6.25$ ）の割合に基づき、普通と無菌マウスとの間ならびに飼料間での比較を行った。その結果、消化管内微生物とこれらの関連物質由来の純タンパク質量は精製全卵タンパク質飼料群で糞乾物中の 0.94%，結晶アミノ酸混合物飼料群では 2.18%，はく離した消化管上皮および消化液由来のタンパク質量は 5.1%，未消化の飼料残渣由来のタンパク質量は 1.23% の成績を得た。

結晶アミノ酸をご恵与いただいた協和醸酵工業株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Yamanaka, M., Nomura, T., Tokioka, J. and Kametaka, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 435 (1980)
- 2) Yamaguchi, M. and Kandatsu, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 809 (1973)
- 3) 岩田久敬: 食品化学, **16** (1955), 養賢堂 (東京)
- 4) Yamanaka, M., Iwai, H., Saito, M., Yamauchi, C. and Nomura, T.: *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **43**, 272 (1972)
- 5) 梅原恵子, 山中聖敬, 橋本一男, 佐々木正五: 実験動物, **33**, 77 (1984)
- 6) Altman, P.L. and Dittmer, D.S. (eds.): *Metabolism*, **32** (1968), Federation of American Societies for Experimental Biology (Maryland)
- 7) 日本栄養士会編: 食品標準成分表, **82** (1972), 第一出版 (東京)

(昭和61年9月18日受理)